

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ感染症（油性アジュバント加）不活化ワクチン（シード）

平成21年7月1日（告示第861号） 新規追加
平成22年4月22日（告示第646号） 一部改正

1 定義

シードロット規格に適合したマイコプラズマ・ハイオニューモニエの培養菌液を不活化し、油性アジュバントを添加したワクチンである。

2 製法

2.1 製造用株

2.1.1 名称

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ NL1042 株又はこれと同等と認められた株

2.1.2 性状

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ基準株に一致する生物学的性状を示す。

2.1.3 マスターシード菌

2.1.3.1 作製、保存及び小分製品までの最高継代数

マスターシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖させ、保存用の容器に分注する。

分注したマスターシード菌は、特定の製造番号又は製造記号を付し、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する

マスターシード菌について、3.1.1の試験を行う。

マスターシード菌は、ワクチンの製造以外の目的で継代しない。マスターシード菌から小分製品までの継代数は、10代以内でなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その継代数とする。

2.1.4 ワーキングシード菌

2.1.4.1 増殖、継代及び保存

ワーキングシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖及び継代する。

ワーキングシード菌は、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

ワーキングシード菌について、3.1.2の試験を行う。

2.1.5 プロダクションシード菌

2.1.5.1 増殖及び保存

プロダクションシード菌は、適当と認められた液状培地で増殖する。

プロダクションシード菌を保存する場合は、凍結して -20°C 以下又は凍結乾燥して 5°C 以下で保存する。

プロダクションシード菌を保存する場合について、3.1.3の試験を行う。

2.2 製造用材料

2.2.1 培地

製造に適当と認められた液状培地を用いる。

2.3 原液

2.3.1 培養

ワーキングシード菌又はプロダクションシード菌を培地に接種して増菌・継代培養後、更に培地に接種して培養したもの又はこれを適当と認められた方法で濃縮したものを培養菌液とする。

培養菌液について、3.2 の試験を行う。

2.3.2 不活化

培養菌液に適当と認められた不活化剤を加えて不活化したもの又はこれを適当と認められた方法で過剰の不活化剤を中和したものを不活化菌液とする。ただし、最終バルクの調整時に過剰の不活化剤を中和してもよい。

不活化菌液について、3.3 の試験を行う。

2.3.3 アジュバントの添加

不活化菌液又は適当と認められた方法で濃縮した不活化菌液に適量のアジュバントを添加したものを原液とする。この場合、適当と認められた保存剤を添加してもよい。ただし、最終バルクの調整時にアジュバントを添加してもよい。

原液について、3.4 の試験を行う。

2.4 最終バルク

原液を混合し、濃度調整したものを最終バルクとする。

2.5 小分製品

最終バルクを小分容器に分注し、小分製品とする。

小分製品について、3.5 の試験を行う。

3 試験法

3.1 製造用株の試験

3.1.1 マスターシード菌の試験

3.1.1.1 同定試験

シードロット規格の 1.4.2.4.1.1 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.1.2 夾雑菌否定試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合は、その試験法とする。

3.1.2 ワーキングシード菌の試験

3.1.2.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.1.3 プロダクションシード菌の試験

3.1.3.1 夾雑菌否定試験

3.1.1.2 を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.2 培養菌液の試験

3.2.1 染色試験

3.2.1.1 試験材料

検体を用いる。

3.2.1.2 試験方法

検体をスライドガラス上でグラム染色するか又はクリスタルバイオレットとヨウ化物で染色し、鏡検する。

3.2.1.3 判定

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ様菌（球状又は球桿状から短桿状の菌）以外の菌を検出し
てはならない。

3.2.2 生菌数試験

3.2.2.1 試験材料

3.2.2.1.1 試料

検体を試料とする。

3.2.2.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

3.2.2.2 試験方法

試料を培地でさらに 10 倍階段希釈し、36～38℃で 14～17 日間培養する。

3.2.2.3 判定

培養液を観察し、色調が変化したものをマイコプラズマ陽性とみなし、CCU を算出する。

検体の菌量は、1mL 中 5×10^6 CCU 以上でなければならない。

3.3 不活化菌液の試験

3.3.1 不活化試験

3.3.1.1 試験材料

3.3.1.1.1 試料

検体を試料とする。

3.3.1.1.2 培地

適当と認められた液状培地を用いる。

3.3.1.2 試験方法

試料を培地に接種し、37℃で 7 日間以上培養する。

3.3.1.3 判定

菌の発育を認めてはならない。

3.4 原液の試験

3.4.1 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その試験方法とする。

3.5 小分製品の試験

3.5.1 特性試験

一般試験法の特性試験法を準用して試験するとき、固有の色調を有する液体でなければならない、異物又は異臭を認めてはならない。小分容器ごとの性状は、均一でなければならない。

3.5.2 pH 測定試験

一般試験法の pH 測定試験法を準用して試験するとき、pH は、固有の値を示さなければならない。

3.5.3 無菌試験

一般試験法の無菌試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.4 チメロサル定量試験

チメロサル添加製剤については、一般試験法のチメロサル定量法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

3.5.5 ホルマリン定量試験

ホルマリン添加製剤については、一般試験法のホルマリン定量法を準用して試験するとき、0.05vol %以下でなければならない。

3.5.6 異常毒性否定試験

一般試験法の異常毒性否定試験法を準用して試験するとき、適合しなければならない。

ただし、3.5.7 の試験を行うときは、本試験は実施しない。

3.5.7 安全試験

3.5.7.1 試験材料

3.5.7.1.1 注射材料

試験品を用いる。

3.5.7.1.2 試験動物

3 週齢の子豚を用いる。

3.5.7.2 試験方法

試験動物 2頭に1回目は両頸部に 2 mL ずつ、2回目は 14 日後に 2 mL を左後肢にそれぞれ筋肉内注射する。それぞれの接種後 14 日間、一般症状を観察する。試験期間中、1回目接種の前日及び3日後、2回目接種の当日及び 14 日後に体重を測定し、それぞれの接種の前日から3日後まで毎日直腸温を測定する。

3.5.7.3 判定

各項目について観察期間中に著しい異常を認めてはならない。

3.5.8 力価試験

3.5.8.1 又は 3.5.8.2 の試験を行う。

3.5.8.1 マウス試験法

3.5.8.1.1 試験材料

3.5.8.1.1.1 注射材料

試験品あるいは試験品を適当と認められた希釈液で希釈したものを注射材料とする。

3.5.8.1.1.2 試験動物

6～7週齢のマウスを用いる。

3.5.8.1.1.3 酵素抗体反応（以下「ELISA」という。）用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原 1（付記 1）を用いる。

3.5.8.1.2 試験方法

試験動物の 20 匹を試験群、5 匹を対照群とする。

注射材料 1.0mL ずつを試験群の腹腔内に注射する。注射後 4 週間目に試験群及び対照群から得られた各個体の血清について、ELISA を行う。

試験群と対照群の血清及び参照陽性血清 1（付記 2）を希釈液 1（付記 3）で 10 倍に希釈したものを、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 1（付記 4）の穴に 100 μ L ずつ加え、希釈液のみの穴を血清対照とする。4 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させた後、洗浄液 1（付記 5）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 1（付記 6）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 90 分間反応させた後、洗浄液 1 で 3 回洗浄する。その後、基質液 1（付記 7）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた後、3 mol/L 水酸化ナトリウム溶液を各穴に 50 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸光度を測定する。

3.5.8.1.3 判定

血清対照の各穴の吸光度値の平均値 + 0.5 以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。

試験群では、70 %以上が抗体価 2,560 倍以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 320 倍以下でなければならない。また、参照陽性血清 1 は、抗体価 2,560 ～ 5,120 倍を示さなければならない。

3.5.8.2 ウサギ試験法

3.5.8.2.1 試験材料

3.5.8.2.1.1 注射材料

試験品を注射材料とする。

3.5.8.2.1.2 試験動物

体重 1.6 ～ 3.2kg のウサギを用いる。

3.5.8.2.1.3 ELISA 用抗原

ポリソルベート 20 抽出抗原 2（付記 8）を用いる。

3.5.8.2.2 試験方法

試験動物の 10 羽を試験群、3 羽を対照群とする。

注射材料 1.0mL ずつを試験群の後肢筋肉内に注射する。注射後 6 週間目に試験群及び対照群から得られた血清について ELISA を行う。

試験群と対照群の各ウサギ血清を等量混合した各プール血清、参照陽性血清 2（付記 9）及び参照陰性血清（付記 10）を希釈液 2（付記 11）で 10 倍に希釈したものを、更に同希釈液で 2 倍階段希釈する。これらの血清希釈液を抗原吸着プレート 2（付記 12）の 3 穴ずつに 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液 2（付記 13）で 3 回洗浄する。次に、各穴に標識抗体 2（付記 14）を 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 1 時間反応させた後、洗浄液 2 で 3 回洗浄する。その後、基質液 2（付記 15）を各穴に 100 μ L ずつ加え、37 $^{\circ}$ C で 10 分間反応させた後、0.5vol % フッ化水素酸溶液を各穴に 100 μ L ずつ加えて反応を停止させ、波長 405nm で各穴の吸光度を測定する。

3.5.8.2.3 判定

参照陰性血清の全穴の平均吸光度値の 2 倍以上の吸光度値を示した血清の最高希釈倍数を抗体価とする。また、参照陽性血清 2 及び試験群の血清の各希釈段階における吸光度値は、3 穴の平均値とする。

試験群では、参照陽性血清 2 の抗体価以上でなければならない。この場合、対照群では、すべて 20 倍以下でなければならない。また、参照陰性血清の平均吸光度値は 0.05 ~ 0.11、参照陽性血清 2 の抗体価は 40 ~ 160 倍を示さなければならない。

4 貯法及び有効期間

有効期間は、製造後 2 年 3 か月間とする。ただし、農林水産大臣が特に認めた場合には、その期間とする。

5 その他

5.1 添付文書記載事項

使用制限期間を設定する製剤については、と畜場出荷前の所定の期間は使用しない旨

付記 1 ポリソルベート 20 抽出抗原 1

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の振とう培養菌液を遠心集菌し、希釈液に懸濁後、4 $^{\circ}$ C で 24 時間攪拌して菌体を洗浄する。洗浄菌体をトリス緩衝液（1）に蛋白濃度 1 mg/mL になるように懸濁後、2 vol % ポリソルベート 20 加トリス緩衝液（2）を等量加え、37 $^{\circ}$ C で 30 分間振とうしながら加温する。遠心後の上清にジエチルエーテルを等量加えて振とう後、エーテル層を完全に除去したもの

（1）トリス緩衝液

トリスヒドロキシメチルアミノメタン 3.03g、塩化ナトリウム 14.61g を水に溶解し全量を 1,000mL としたもの

（2）2 vol % ポリソルベート 20 加トリス緩衝液

ポリソルベート 20 20mL とトリス緩衝液 980mL を混合したもの

付記 2 参照陽性血清 1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したマウスの血清で、抗体価が 2,560 ~ 5,120 倍となるように調整し、凍結又は凍結乾燥したもの

付記 3 希釈液 1

1,000mL 中

塩化ナトリウム 8.0 g

塩化カリウム 0.2 g

リン酸二水素カリウム 0.2 g

無水リン酸一水素ナトリウム 1.15 g

水 残量

121 $^{\circ}$ C で 15 分間高圧滅菌する。

付記4 抗原吸着プレート1

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株に対するウサギ免疫血清（付記 16）を炭酸緩衝液 1（付記 17）で 100 倍に希釈後、96 穴マイクロプレートの各穴に 100 μ L ずつ加え、4 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させる。その後、洗浄液 1 で 3 回洗浄する。0.1w/v %ゼラチン液（付記 18）を各穴に 100 μ L ずつ加え、4 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させる。さらに、洗浄液 1 で 3 回洗浄後、ポリソルベート 20 抽出抗原 1 を希釈液で蛋白量 12.5 μ g/mL になるように希釈し、各穴に 100 μ L ずつ加え、4 $^{\circ}$ C で 18 時間反応させた後、洗浄液 1 で 3 回洗浄したもの

付記5 洗浄液 1

ポリソルベート 20 0.5mL と希釈液 1,000mL を混合したもの

付記6 標識抗体 1

アルカリフォスファターゼ標識抗マウス IgG 抗体を希釈液で至適濃度に希釈したもの

付記7 基質液 1

p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム 100mg を基質緩衝液（付記 19）100mL で溶解したもの

付記8 ポリソルベート 20 抽出抗原 2

製造用株又はこれと同等の抗原性を有する株の培養菌液を遠心集菌し、蛋白量として 2 mg/mL となるようにリン酸緩衝液 2（付記 20）中に懸濁し、2 vol %ポリソルベート 20 溶液を等量加えて、37 $^{\circ}$ C で 90 分間振とうしながら加温し、遠心後に採取し、適当な濃度に調製したもの

付記9 参照陽性血清 2

豚での有効性が確認されている最少抗原量を含有するワクチン（ 3×10^8 CCU/dose）の 1 mL をウサギに免疫して得られた血清で、ELISA 抗体価 40 ~ 160 倍となるように調製し、小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの

付記10 参照陰性血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ抗体陰性のウサギ血清で ELISA 抗体価 20 倍以下のものを小分けして、凍結又は凍結乾燥したもの

付記11 希釈液 2

1,000mL 中

塩化ナトリウム	9.0 g
トリスヒドロキシアミノメタン	1.21 g
牛血清アルブミン	10.0 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

pH を 7.3 ~ 7.5 に調整する。

付記12 抗原吸着プレート 2

ポリソルベート 20 抽出抗原 2 を炭酸緩衝液 2 (付記 21) で蛋白量として $10 \mu \text{g/mL}$ に調製した抗原液をマイクロプレートの各穴に $100 \mu \text{L}$ ずつ分注し、プレートをシールして室温で 18 ~ 72 時間感作したもの

付記 13 洗浄液 2

1,000mL 中

塩化ナトリウム	9.0 g
ポリソルベート 20	0.5 mL
水	残 量

pH を 7.3 ~ 7.5 に調整する。

付記 14 標識抗体 2

ペルオキシダーゼ標識ヤギ抗ウサギ IgG (H + L) を希釈液 2 で至適濃度に希釈したもの

付記 15 基質液 2

A 液 : 0.6g の 2,2'-アジノージ (3-エチルベンゾチアゾリンスルホネート) を 1,000mL のグリシン緩衝液で溶解したもの

B 液 : 0.02vol % 過酸化水素溶液

A 液と B 液を使用時に等量混合する。

付記 16 ウサギ免疫血清

マイコプラズマ・ハイオニューモニエ J 株又はこれと同等の免疫原性を有する株で免疫したウサギの血清で、発育阻止試験において直径 3 mm 以上の阻止帯を示すもの

付記 17 炭酸緩衝液 1

A 液 : 炭酸ナトリウム 5.3g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

B 液 : 炭酸水素ナトリウム 4.2g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

A 液と B 液を混合し、pH を 9.6 に調整する。

付記 18 0.1w/v %ゼラチン液

ゼラチン 1.0g を希釈液 1,000mL で溶解したもの

付記 19 基質緩衝液

塩化マグネシウム六水和物 0.049g、ジエタノールアミン 96mL を水に溶解後、5 mol/L の塩酸で pH を 9.8 に調整し、全量を 1,000mL としたもの

付記 20 リン酸緩衝液 2

A 液 : リン酸二水素ナトリウム一水和物 2.75g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

B 液 : 無水リン酸一水素ナトリウム 2.84g を水に溶解し、全量を 1,000mL とする。

A 液 775mL と B 液 225mL を混合して pH を 7.0 に調整する。この液に、塩化ナトリウム 14.6g、硫酸マグネシウム 1.2g を加え、全量を 1,000mL にする。

付記 21 炭酸緩衝液 2

1,000mL 中

炭酸ナトリウム	1.59 g
---------	--------

炭酸水素ナトリウム	2.93 g
水	残 量

pH を 2 mol/L 水酸化ナトリウム溶液で 9.55 ~ 9.65 に調整した後、水を加えて全量を 1,000mL にする。